

発明の名称

肝細胞癌検出法

5 発明の背景

1. 技術分野

本発明は、慢性肝炎患者等から採取した被検組織の遺伝子の発現レベルを測定する肝細胞癌の検出法に関する。

10

2. 従来技術

現在、ウイルス性肝炎の患者は世界中で5億人とも言われている。特に、南アジアにおいては、人口の24.8%がB型もしくはC型肝炎に感染しており、その5%が慢性化している。この慢性型の肝炎は、約20年の期間を経て、肝細胞癌に移行することが知られている。

現在、肝細胞癌の検出法及び診断法としては、腹部超音波検査、腹部MRI検査、腹部CT、血管造影、血清中腫瘍マーカーの生化学的検査、肝生検などが知られている。しかし、遺伝子の発現レベルで肝細胞癌を有効に検出又は測定する方法は知られていない。

15

癌化は、正常細胞が外界からの種々の要因によって影響を受け、遺伝子レベルで変化あるいは変異を生じ、これがタンパク質の持つ機能に影響し、最終的に正常細胞の営みが破綻した結果の一つの表れである。肝細胞癌においても、遺伝子レベルで変化又は変異が生じていることが、数多く報告されている。

20

たとえば、c-mycの遺伝子発現量が、33.3%から36.4%に増加していることが報告されている（Oncology, 1999, 57, p. 157-163; Journal of Formos Medical Association, 1993, 92, p. 866-870）。

また、K-rasは、0%から16.7%の頻度で点突然変異が生じていることが報告されている（Anticancer Research, 1995, 15, p. 859-861; Oncogene, 1991, 6, p. 8

57-862)。

P53 も、23.1% から 50% の頻度で点突然変異の生じることが報告されている (Cancer, 1994, 74, p.30-37; Gastroenterology, 1999, 117, p.154-160; Journal of Hepatology, 1993, 19, p.312-315; British Journal of Cancer, 1999, 80, p.59-66; Journal of Gastroenterological Hepatology, 1995, 10, p.179-185)。

さらに、Rb および p53 では、ヘテロ接合 (heterozygosity) の消失が、それぞれ 42.9-43.1% 及び 50-52.9% で生じることが観察されている (Journal of Hepatology, 1993, 19, p.312-315; British Journal of Cancer, 1999, 80, p.59-66; Cancer Research, 1994, 54, p.4177-4182; European Journal of Cancer, 1999, 35, p.1730-1734)。

また、アルドラーゼ B 遺伝子の発現量の低下 (Journal of Clinical laboratory analysis, 1994, 8, p.144-148)、アルブミン遺伝子の発現量の低下 (Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1997, 45, p.79-87) に関する報告がある。

また、ラット肝発ガンモデルにおいて、カルバミルフォスフェート合成酵素 1 遺伝子の発現量が癌の悪性度に比例して低下するという報告もある (Scientia Sinica Series B, 1988, 31, p.197-203)。

しかし、これら遺伝子の発現量の変化や変異に関する報告は、前癌性の肝炎が肝細胞癌に移行することの判断材料として十分なものとはいえず、肝細胞癌を検出するための有効な方法は、未だ確立されていない。

20

発明の概要

本発明は、肝細胞癌の有効な検出方法を提供することを主な目的とする。さらに、肝細胞癌を検出するための有効な手段を提供することを目的とする。

本発明者らは、慢性肝炎患者の肝臓における癌部位と非癌部位における遺伝子の発現レベルについて網羅的な比較検討を行った。その結果、癌化により発現量の著しく低下する遺伝子が存在することを見出し、更に鋭意検討を重ねて、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下の肝細胞癌の検出方法、肝細胞癌の早期検出方法、並び

に肝細胞癌を検出するための DNA チップに関する。

項 1. 次の工程を有する肝細胞癌を検出する方法：

(a) 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定する工程、

(b) (a) の工程で測定した遺伝子の発現量を、コントロールにおける (a) の工程で測定した遺伝子と対応する遺伝子の発現量と比較する工程。

10 項 2. 次の工程を有する肝細胞癌を検出する方法：

(a) 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼ B 遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子、チトクローム P450 サブファミリー 2E1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定する工程、

(b) (a) の工程で測定した遺伝子の発現量を、コントロールにおける (a) の工程で測定した遺伝子と対応する遺伝子の発現量と比較する工程。

20 項 3. (a) の遺伝子の発現量を測定する工程が、測定する遺伝子の転写物の量を定量することにより遺伝子の発現量を測定する工程である、項 1～2 のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

項 4. (a) の遺伝子の発現量を測定する工程が、遺伝子転写物から調製された c 25 DNA をテンプレートとして、測定する遺伝子の DNA の全域または一部を増幅することにより遺伝子の発現量を測定する工程である、項 1～2 のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

項5. (a) の遺伝子の発現量を測定する工程が、インベーダー法を用いて遺伝子の発現量を測定する工程である、項1～3のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

5 項6. (a) の遺伝子の発現量を測定する工程が、測定する遺伝子を含む転写物から調製した標識化cDNAを、固定化された測定する遺伝子のDNAの全域または一部とハイブリダイゼーションさせることにより遺伝子の発現量を測定する工程である、項1～2のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

10 項7. (a) の被検組織が、慢性肝炎患者の肝組織である項1～6のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

15 項8. 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を定期的に測定する工程を有する肝細胞癌の早期検出方法。

20 項9. 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を定期的に測定する工程を有する肝細胞癌の早期検出方法。

25

項10. プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域

又はその一部を固定化してなる肝細胞癌検出用DNAチップ。

項 11. プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる
 5 群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又はその一部を固定化してなる肝細胞癌検出用DNAチップ。

10

図面の簡単な説明

図1は、肝細胞癌組織および非癌組織における遺伝子について、電気泳動を行って、2つの組織の遺伝子の発現量を比較した図面である。

GTVA及びGTVCはアンカープライマーを、APはアービタリープライマーを
 15 示す。またA-Dは被験患者を示す。A,BはB型ウイルス感染患者を、C,DはC型ウイルス感染患者を示す。

レーンNは非癌組織から調製した試料、レーンTは癌組織から調製した試料の電気泳動パターンである。また、Mは分子量マーカーを示す。

矢印は、電気泳動の結果、肝細胞癌における発現量がコントロールにおける発
 20 現量と比較して低下している遺伝子のバンドを示す。

発明の詳細な説明

以下、本発明を詳細に説明する。

なお、本明細書におけるアミノ酸、蛋白質、塩基配列、核酸等の略号による表
 25 示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書の作成のためのガイドライン」（特許序編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

(1) 癌化により発現量が低下する遺伝子

本発明者は、慢性肝炎患者の肝臓における癌部位と非癌部位における遺伝子の発現レベルの網羅的な比較検討を行った。

具体的には、慢性肝炎患者の肝臓における癌部位と非癌部位から調製したmRNA をもとに、蛍光標識化した cDNA ライブラリーを合成し、これを電気泳動により分離した。次いで、両組織における蛍光強度の差異を調べ、癌部位における顕著な発現量の低下が認められるものを、肝細胞癌の検出に有用な候補遺伝子としてピックアップした(図 1)。次いで、該候補遺伝子をクローニングし、それらの塩基配列を決定した。更に、該候補遺伝子について、癌部位および非癌部位から調製したmRNA 溶液を用いて、リアルタイム RT-PCR の手法により定量化を行って、実際に、肝細胞癌において低発現であることを確認した。

そして、肝細胞癌において発現レベルが顕著に低下している 8 つの遺伝子を選択した。

この 8 つの遺伝子について、GenBank 遺伝子データベースを用いて解析した結果、該 8 つの遺伝子はそれぞれ配列表の配列番号 1 ~ 8 で表される塩基配列を有する遺伝子であることがわかった。

配列番号 1 で表される塩基配列を有する遺伝子は、アルドラーゼ B をコードする遺伝子である。

配列番号 2 で表される塩基配列を有する遺伝子は、カルバミルフォスフェート合成酵素 I をコードする遺伝子である。

配列番号 3 で表される塩基配列を有する遺伝子は、プラスミノーゲンをコードする遺伝子である。

配列番号 4 で表される塩基配列を有する遺伝子は、EST51549 (GenBank Ac. No. AA345522) であって、その機能が未だ明らかになっていない遺伝子である。

配列番号 5 で表される塩基配列を有する遺伝子は、アルブミンをコードする遺伝子である。

配列番号 6 で表される塩基配列を有する遺伝子は、チトクローム P450 サブファミリー2E1 をコードする遺伝子である。

配列番号 7 で表される塩基配列を有する遺伝子は、レチノール結合タンパク 4 をコードする遺伝子である。

配列番号 8 で表される塩基配列を有する遺伝子は、オーガニックアニオントラ NSP-1 をコードする遺伝子である。

5 該 8 つの遺伝子は、表 1 に示されるように、肝細胞癌において遺伝子の発現レベルが著しく低下する。特に、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントラ NSP-1 遺伝子の肝細胞癌における発現量の低下は、本発明において初めて見出されたものである。

10 (2) 検出方法

本発明の検出方法は、上記被検組織の肝細胞癌において発現量が低下する遺伝子の発現量を測定する工程を有することを特徴とする。

上述したように、該 8 つの遺伝子は、肝細胞由来の癌において、遺伝子の発現量が顕著に低下している。よって、これら遺伝子の発現量を測定し、コントロールと比較することにより、肝細胞癌を検出することが可能となる。

本発明においては、特に、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントラ NSP-1 遺伝子の 4 つの遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量の測定を行う。該測定は、上記 4 つの遺伝子のうちいずれか一つの遺伝子の発現量の測定でもよく、該 4 つの遺伝子から選ばれる数個の遺伝子の発現量の測定でもよく、また該 4 個の遺伝子全ての遺伝子の発現量の測定でもよい。

また、本発明においては、上記 4 つの遺伝子に加えて、更に 4 つの遺伝子、換言すると、アルドラーゼ B 遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子、及び、チトクローム P450 サブファミリー 2E1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定を行うことが好ましい。

プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントラ NSP-1 遺伝子の 4 つの遺伝子からなる群から

選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量の測定に加えて、更に、アルドラーゼ B 遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクローム P450 サブファミリー 2E1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定を行うことにより、更に精度の高い測定或いは検出を行うことが可能になる。

特に、上記 8 つ全ての遺伝子、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子、オーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子、アルドラーゼ B 遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクローム P450 サブファミリー 2E1 遺伝子の発現量の測定を行うことが好ましい。

また、本発明の検出方法においては、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子の 4 つの遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量の測定を含む限り、上記 8 つの遺伝子以外の公知の他の遺伝子の発現量の測定を含むものであってもよい。

遺伝子の発現量を測定する方法は、特に制限されることはなく、従来公知の方法を適宜用いることができる。例えば、転写物の量を定量する方法、又は、翻訳物を定量する方法を用いることができる。

遺伝子の転写物の量を定量する方法とは、被検組織から mRNA を抽出し、該遺伝子に由来する RNA 産物の量を測定する方法である。

被検組織からの RNA 抽出および精製は、常法に従って行うことができる。具体的には、次のように行うことができる。被検組織にフェノールとチオシアン酸グアニジンを含む溶液を添加し、溶解またはホモジナイズした後、クロロホルムを加え、次いで遠心分離操作により上層の水溶液層と下層の有機層に分離する。RNA は、水層に回収されるため、上層を分取することによって RNA を回収する。次いで、該回収液に、例えばイソプロパノールなどの低級アルコールを添加し、RNA を沈殿せしめ洗浄することにより、高純度の RNA を得る。抽出された RN

A は、トータル RNA (totalRNA) として用いてもよく、もしくは精製 mRNA として用いてもよい。

抽出された RNA 量を定量する方法としては、各種の方法を用いることができる。例えば、RT-PCR、リアルタイム RT-PCR、インベーダー法、DNA チップ、
5 ノーザンプロット解析などを用いることができる。

RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR は、mRNA から相補的 DNA (cDNA) を合成し、適当なプライマーおよび DNA ポリメラーゼ (一般的には耐熱性 DNA ポリメラーゼ) を用いて目的領域の DNA を合成するものである。通常、DNA の変性、アニール及び伸長反応の工程を繰り返すことによって、DNA
10 を増幅させてから、RNA 量を測定する。

RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR において使用されるプライマーは、目的遺伝子を特異的に増幅できる領域からなるものであれば、塩基配列中のどの領域を使用してもよい。また塩基配列の長さも特に制限されない。通常は、20-30 ヌクレオチドのものを使用する。

15 またリアルタイム RT-PCR において使用される DNA 鎖と親和性を有する蛍光分子としては、CYBR グリーン (CYBR Green)、ピコグリーン (PicoGreen)、エチジウムプロマイドなどが用いられる。好適には CYBR グリーンが用いられる。

RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR は、DNA を数 10 万倍に増幅でき、高感度であること、被検試料が微量ですむことなどの点から、好適に用いられる。

20 また、インベーダー法とは、RNA または DNA 上において、これと相補的なプローブ (インベーダープローブ) および非相補的な部分を 5' 側に持つ相補的プローブ (シグナルプローブ) を結合させることにより、この立体構造を認識する酵素クレアベーゼ (Cleavase) にてシグナルプローブを切断せしめる工程、および切断されたシグナルプローブのいずれかの断片を検出することにより遺伝子の発現レベルを測定する工程を有する方法である。

インベーダープローブとしては、目的転写物に対して相同的なものを用いればよく、特に塩基配列の長さに制限はない。また、シグナルプローブについても、インベーダープローブと転写物上で 3 重鎖構造を形成する塩基配列、具体的には

5' 側に非相補部位および 3' 側に相補部位を持ちクレアベーゼが立体構造を認識し切断できるよう設計されたプローブであれば、塩基配列の長さ等は特に制限されない。切断されたシグナルプローブ断片の測定又は検出法としては、シグナルプローブ断片が転写物の非相補部位である場合は、該断片と蛍光物質標識プローブによりクレアベーゼで切斷せしめ、得られた断片の蛍光シグナルを測定する方法を例示することができる。この場合の蛍光物質標識プローブとしては、シグナルプローブ断片と相補的塩基配列を一部にもち、該断片がハイブリダイゼーションした時、上述と同様クレアベーゼ認識立体構造を形成するよう設計された DNA プローブであって、切斷遊離部分に発光物質が、また非切断部分に消光物質が標識化されており、未切斷状態において発光シグナルを発しない状態のものであれば、特に限定されない。発光物質としては、通常蛍光物質又はりん光物質等が好適に使用される。消光物質としては Cy3 等が好適に使用される。

また、シグナルプローブ断片が転写物の相補部位である場合は、例えば該断片に対して相補部分を含む固定化オリゴヌクレオチドに該遊離断片を捕獲させ、フルオレセインを蛍光色素として用いて、蛍光抗体法を用いて検出する方法等を例示することができる。これは、市販の測定キットなどを用いて行うことができる。

インベーダー法は、プローブ自体を標識化する必要がないという点、および增幅操作を要しないという点などから、好適に用いられる。

なお、DNAチップに関しては、(5) DNAチップにおいて詳述する。

一方、遺伝子の翻訳物を定量する方法とは、目的遺伝子がコードするタンパク質を定量する方法である。具体的には、タンパクを特異的に認識する抗体を用いた免疫学的測定法により目的遺伝子がコードするタンパク質の量を定量する方法を例示することができる。免疫学的測定法としては、例えばウエスタンプロット解析、ラジオイムノアッセイ、ELISA 法などが挙げられる。

本発明の検出法においては、上述のような方法で測定した被検組織における遺伝子の発現量を、コントロールにおける対応する遺伝子の発現量と比較する。

具体的には、(a) 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺

伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定し、次いで、

(b) (a) の工程で測定した遺伝子の発現量を、コントロールにおける (a) の工程で測定した遺伝子と対応する遺伝子の発現量と比較する。

または、(a) 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子

からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブミン遺伝子、チトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定し、次いで、

(b) (a) の工程で測定した遺伝子の発現量を、コントロールにおける (a) の工程で測定した遺伝子と対応する遺伝子の発現量と比較する。

コントロールとして使用できる組織は、検出法において用いる手段や検出の目的に応じて適宜設定することができる。具体的には、健常者組織或いは慢性肝炎患者における肝組織の非癌部位、又は、健常者の末梢血単核球などを用いること

ができる。

被検組織における遺伝子の発現量が、コントロールにおける対応する遺伝子の発現量と比較して低い場合には、被検組織が肝細胞癌であること又は被検組織が肝細胞癌を含んでいると判断され、肝細胞癌が検出できる。

20 (3) 判定方法

上述した8つの遺伝子の発現レベルを測定することによって、被検組織が肝細胞癌であるか否か、又は肝細胞癌の悪性度の判定などを行うことができる。

具体的には、次のように行うことができる。

まず、被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定する。

又は、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝

子及びオーガニックアニオントランスポーターC 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼ B 遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクローム P 450 サブファミリー 2E1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子 5 の発現量を測定する。

次に被検組織における測定した遺伝子の発現量と、コントロールにおける対応する遺伝子の発現量とを比較する。

コントロールに比べて被検組織における遺伝子の発現量が低い場合に、被検組織が肝細胞癌であること、又は被検組織中に肝細胞癌等の癌細胞の存在する可能性が高いことを判定することができる。また、発現量の低下の度合をみて、癌の悪性度を判定することができる。 10

該判定方法は、肝炎患者の診断又は治療などに利用することができる。

(4) 早期検出法

15 上記 8 つの遺伝子の発現レベルを定期的に測定することにより、肝細胞癌又は肝細胞癌に移行する可能性の高い部位の早期検出を行うことができる。

具体的には、以下のように行うことができる。

被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を定期的に測定する。 20

又は、被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼ B 遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子、チトクローム P450 サブファミリー 2E1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を定期的に測定する。 25

該定期的な測定の結果、以前の測定時の発現量と比較して発現量の低下が見られた場合に、該被検組織を、肝細胞癌或いは肝細胞癌に移行する可能性の高い部位として検出することができる。

特定遺伝子の発現量の変動を定期的に測定することにより、肝細胞癌の発症や進行を早い段階で検出することができる。

定期的期間、換言すると、測定と測定の間の期間は、患者や被検者の状態によって適宜設定することができる。例えば、半年もしくは1年毎に定期的に測定を行うことができる。

本発明の早期検出方法は、肝細胞癌の予防や治療、肝炎患者の予後の解析等に利用することができる。

(5) DNA チップ

上記検出方法、判定方法及び早期検出方法は、測定対象となる遺伝子、換言すると、被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又は一部を固定化したDNAチップを用いることによって、効率よく行うことができ、更には、該遺伝子群に加えて被検組織におけるアルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブミン遺伝子、チトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又は一部を固定化したDNAチップを用いることによって、より効率よく行うことができる。

遺伝子のDNAを基板に固定化したものには、DNAアレイと呼称されるものもある。DNAアレイはさらにDNAマイクロアレイおよびDNAマクロアレイに分類される。本発明のDNAチップには、DNAアレイ(DNAマイクロアレイ及びDNAマイクロアレイ)と呼称されるものも含まれる。

本発明のDNAチップは、測定対象となる遺伝子の転写領域からなるDNAの

全域又はその一部を公知の方法に従って合成し、該 DNA を支持体に固定化するか、直接支持体で合成することによって、製造することができる。

支持体（または基盤）としては、DNA を固定化できるものであれば特に制限はない。例えば、シリコンチップ、スライドガラスおよびナイロン膜などを用いることができる。

固定化の方法は、一般に用いられる方法であれば特に制限はない。好適には、スポットターまたはアレイヤーなどを用いて DNA をスポットする方法、または支持体上で順次スクレオチド合成を行う方法などを例示することができる。

支持体に固定化する DNA は、上記 8 つの遺伝子の転写物より調製された標識化 cDNA と特異的にハイブリダイゼーションするものであれば、領域および塩基配列の長さは特に制限されない。

例えば、上記 8 つの遺伝子転写物から調製された cDNA に基づく PCR 産物、8 つの遺伝子の転写領域の塩基配列に基づいて作成した合成オリゴスクレオチド又はその部分断片なども好適に用いることができる。

本発明のDNAチップは、具体的には、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又はその一部を固定化してなるものである。

又は、被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子、チトクロームP450サブファミリー2E1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又はその一部を固定化してなるものである。

本発明のDNAチップには、上記 8 つの遺伝子以外に、他の公知の遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又はその一部、或いは、合成スク

レオチド又はその断片などを、所望に応じて更に固定化してもよい。

本発明のDNAチップは、肝細胞癌検出用、更に具体的には、肝細胞癌判定用又は肝細胞癌早期検出用などとして、好適に用いることができる。

5

具体的には、本発明のDNAチップを以下のように、用いることができる。

被検組織から、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の転写物を抽出し、該遺伝子の転写物から調製した標識化cDNAを、本発明のDNAチップ上でハイブリダゼーションさせることにより、遺伝子の発現量を測定して、本発明の肝細胞癌の検出法における測定を行うことができる。

15 例えはFluorescein(緑色)あるいはPhycoerythrin(赤色)、またはこれらにビオチンを介在させた物、あるいはCy3-deoxyuridine triphosphate, dUTP, Cy5-dUTPで被検組織およびコントロールの転写物から調製されたcDNAを各々異なる色素でラベル化する。次いで、DNAチップに結合させた後、蛍光強度の違いをコンピュータ処理し、被検組織における目的遺伝子の発現レベルがコントロールにおける目的遺伝子の発現レベルと比較し、どの程度低下しているのかを数値化することにより本発明の肝癌細胞の検出を行うことができる。あるいは、この操作において、蛍光顕微鏡を用いて視覚的に色の違いにより肝癌細胞の検出を行うことも可能である。

25 本発明の検出方法、判定方法又は早期検出方法或いはDNAチップの製造において用いる種々の操作、例えはDNAの化学合成、切断、削除、結合あるいは付加、および遺伝子転写物のcDNA合成に用いる酵素、あるいは遺伝子転写物の単離、精製、増幅又は複製などは、本願出願前公知の方法に従って行うことができ

る。また、塩基配列の決定あるいは確認は、例えばジデオキシ法やマキサムギルバート法に従って行うことができる。

以下、実施例を用いて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されることはない。

1. 肝細胞癌において発現量が低下する遺伝子の決定

試料として、ウイルス性慢性肝炎患者の肝臓組織における肝細胞癌病変部の細胞 (B型ウイルス性肝炎患者 2 検体、C型ウイルス性肝炎患者 2 検体)、および、同一肝臓組織における非癌部位の細胞を用いた。まず、肝炎患者から採取した癌組織および非癌化組織からトータル RNA を抽出した。次いで、トータル RNA の 1ug に、3'側部分 ROX 蛍光標識化オリゴ-dT (oligo-dT ; GT15MG, GT15M A, GT15MT, GT15MC:M は G, A, C の混合/グライナーラボルテクニック ジャパン /日本、ジエチルピロカルボネート処理水 11ul 中 50pmol 含有) を加え、70°Cで 10 分間処理し、さらに以下の組成からなる溶液 A を加え、最終容量を 20ul とした。

(溶液 A の組成)

5X ファーストストランドバッファー (first strand buffer) (0.25M tris-HCl, pH7.5; 0.375 mol/L KCl; 0.05 mol/L ジチオトレイトール (dithiothreitol) および 0.015 mol/L MgCl₂) 4 ul, 0.1 mol/L ジチオトレイトール 2 ul, 2.5 mM/L デオキシヌクレオチドトリフォスフェート (deoxynucleotide triphosphates(dNTPs)) 1ul, リボヌクレアーゼ インヒビター (40 ユニット ; 和光純薬工業株式会社 (Wako Pure Chemical Industries, Japan)) 1ul およびスーパースクリプト II リバーストランスクリプターゼ (superscript II reverse transcriptase) (200 ユニット ; BRL, USA) 1ul.

上記 RNA 溶液を、42°Cで一時間反応させ、cDNA を合成した後、ジエチルピロカルボネート処理水 80ul を添加し、5 倍に希釈した。次いで、得られた cDNA

A をテンプレートとして PCR により目的遺伝子の增幅を行った。添加試薬および反応条件を以下に示す。

添加試薬：反応液 2ul、10xPCR バッファー(100mmol/L Tris-HCl、15 mm
5 ol/L MgCl₂、500 mmol/L KCl、および 1mg/ml geratin,pH8.5)
2ul、2.5 mmol/L dNTPs 1.6 ul、Taq DNA ポリメラーゼ (polymerase) (5 ユニット/ul; Roche Molecular Systems, NJ)0.2ul、
5pmol 3'側 ROX 蛍光標識化オリゴ-d T プライマーおよび 10 pmo
1 5'側 ROX 蛍光標識化オリゴ-d T プライマー。

10 反応条件：1 サイクル 95°C/3 分間、40°C/5 分間、72°C/5 分間、
2-40 サイクル 95°C/30 秒間、40°C/2 分間、72°C/5 分間。

上記のように癌組織および非癌組織から調製した反応液それぞれについて、7. 5M 尿素を含む 6% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、FM BIO
15 II イメージング アナライザー（宝酒造株式会社）を用いて遺伝子の発現量を解析した。その結果、非癌組織における遺伝子と癌組織における遺伝子との蛍光強度に差異があり、癌組織において発現レベルが低下していると考えられる遺伝子（矢印）が複数確認された（図 1）。該蛍光強度に差異のみられるバンド部分を切断し、次いで、この切断フラグメントを TE (Tris-HCl, EDTA) バッファー
20 100ul 中で一時間浸透することにより、DNA の抽出を行った。その後、該抽出液をテンプレートとして、PCR により再増幅を行った。反応条件は前記 PCR と同様とした。

再増幅した後の PCR 産物を、3% アガロースゲル電気泳動後、バンド部分を切断し、GFX PCR DNA および Gel Band Purification Kit(Amersham Pharmacia Biotech, NJ)を用いて回収した。再増幅した PCR 産物の DNAs は、クローニングベクター pCRII(Invitrogen Japan, Japan)を用いてクローニングを行った。そして、DNA 鎮は DNA 解析装置 ABI377(Applied Biosystems, USA)を用いて塩基配列を決定した。

以上の操作を行った結果、肝細胞癌組織において顕著に発現量の低下している 8 つの遺伝子を見出した。

該 8 つの遺伝子の塩基配列を GenBank で解析した結果、該遺伝子が、配列表の配列番号 1 ~ 8 で表される塩基配列を有する遺伝子、換言すると、アルドラー 5 ゼ B 遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素 I 遺伝子、プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、アルブミン遺伝子、チトクローム p450 サブファミリー2E1 遺伝子、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子の 8 つの遺伝子であることがわかった。

10 2. 肝細胞癌発現量低下遺伝子の癌細胞における発現量の測定

慢性肝炎患者由来肝細胞癌組織（慢性肝炎患者各 20 名から採取した検体）から抽出して調製したトータル RNA をもとに、リアルタイム RT-PCR を行った。

具体的には次のように行った。トータル RNA 溶液に対して、10X 反応バッファー (Taq polymerase, dNTP, MgCl₂ および CYBR グリーンフルオレッセン 15 ト (Green fluorescent(Roche Diagnostics))を 2 uL、テンプレート cDNA を 2uL およびオリゴヌクレオチドプライマーを含む溶液 20uL を用いて増幅反応を行った。

反応条件は、95°C/10 秒間、65°C/10 秒間、72°C/30 秒間を 40 サイクル行った。

PCR 増幅装置は、ライトサイクラー (Light Cycler ; Roche Diagnostics, Germany) を使用した。

測定された遺伝子の発現レベルを、検体を採取した慢性肝炎患者の非癌組織部分の細胞における同じ遺伝子の発現レベルと比較し、その結果を表 1 に示した。

表1

| 遺伝子 | GenBank ACC. No. | 発現レベルが50%以上低下した肝細胞癌患者 | | | | total (n=20) |
|-------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|-----------------|
| | | HBV(-),HCV(-) (n=2) | HBV(+),HCV(-) (n=3) | HBV(-),HCV(+) (n=15) | | |
| アルドーラーゼB遺伝子 | X02747 | 2/2 (100%) | 2/3 (66.7%) | 14/15 (93.3%) | 18/20 (90.0%) | |
| カルメリルオスマフェート合成酵素遺伝子 | D90282 | 2/2 (100%) | 2/3 (66.7%) | 11/15 (73.3%) | 15/20 (75.0%) | |
| プラスミノーゲン遺伝子 | X05199 | 2/2 (100%) | 2/3 (66.7%) | 11/15 (73.3%) | 15/20 (75.0%) | |
| EST51549 | AA345522 | 2/2 (100%) | 2/3 (66.7%) | 11/15 (73.3%) | 15/20 (75.0%) | |
| アルカン遺伝子 | V00495 | 2/2 (100%) | 1/3 (33.3%) | 12/15 (80.0%) | 15/20 (75.0%) | |
| チクロームP450サブファミリー2E1遺伝子 | J02843 | 2/2 (100%) | 1/3 (33.3%) | 10/15 (66.7%) | 13/20 (65.0%) | |
| レチノール結合タンパク遺伝子 | X00129 | 2/2 (100%) | 1/3 (33.3%) | 9/15 (60.0%) | 12/20 (60.0%) | |
| オーガニッケートransporter C遺伝子 | AB026257 | 2/2 (100%) | 1/3 (33.3%) | 8/15 (53.3%) | 11/20 (55.0%) | |

表1において、HBVはB型肝炎ウイルスを、HCVはC型肝炎ウイルスを示す。また、(+)は感染していることを、(-)は非感染であることを示す。

表1における分数の数値は、分子が、遺伝子の発現レベルが50%以上低下した患者の数を、分母が全被検患者の数を示す。また、()内の数値は、遺伝子の発現レベルが50%以上低下した患者の数の全被検患者の

数に対する割合を示す。

表1の結果に示されるように、慢性肝炎の種類に関係なく、肝細胞癌では8遺伝子の発現レベルが50%以上という高い確率で低下していることが明らかになった。

5

上記で明らかにされるように、肝細胞癌においては、アルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、プラスミノーゲン遺伝子、EST51 549、アルブミン遺伝子、チトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝

10 子の発現レベルが低下している。

これらの遺伝子の発現量を測定し、コントロールにおける発現量と比較して、発現量の低下の有無を測定することにより肝細胞癌の検出を適切に行うことが可能となる。また、該遺伝子の発現レベル、また低下している場合はその度合を測定することにより、肝細胞癌の判定や早期検出を適切に行うことができる。また、該8つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又はその一部又はその一部 15 を固定化することにより得られるDNAチップは、肝細胞癌検出の有用なツールとして利用し得る。

このように、本発明の技術は、肝細胞癌の予防、診断又は治療、並びに慢性肝炎の予後の解析などに、有用に利用し得るものである。

20

請求の範囲

1. 次の工程を有する肝細胞癌を検出する方法：
 - (a) 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定する工程、
(b) (a)の工程で測定した遺伝子の発現量を、コントロールにおける(a)の工程で測定した遺伝子と対応する遺伝子の発現量と比較する工程。
- 10 2. 次の工程を有する肝細胞癌を検出する方法：
 - (a) 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブミン遺伝子、チトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定する工程、
(b) (a)の工程で測定した遺伝子の発現量を、コントロールにおける(a)の工程で測定した遺伝子と対応する遺伝子の発現量と比較する工程。
- 20 3. (a)の遺伝子の発現量を測定する工程が、測定する遺伝子の転写物の量を定量することにより遺伝子の発現量を測定する工程である、請求項1～2のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。
- 25 4. (a)の遺伝子の発現量を測定する工程が、遺伝子転写物から調製されたcDNAをテンプレートとして、測定する遺伝子のDNAの全域または一部を増幅することにより遺伝子の発現量を測定する工程である、請求項1～2のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

5. (a) の遺伝子の発現量を測定する工程が、インベーダー法を用いて遺伝子の発現量を測定する工程である、請求項 1～3 のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

5 6. (a) の遺伝子の発現量を測定する工程が、測定する遺伝子を含む転写物から調製した標識化 cDNA を、固定化された測定する遺伝子の DNA の全域または一部とハイブリダイゼーションさせることにより遺伝子の発現量を測定する工程である、請求項 1～2 のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

10 7. (a) の被検組織が、慢性肝炎患者の肝組織である請求項 1～6 のいずれかに記載の肝細胞癌を検出する方法。

8. 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子からなる群
15 から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を定期的に測定する工程を有する肝細胞癌の早期検出方法。

9. 被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子からなる群
20 から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼ B 遺伝子、カルバミルfosフェート合成酵素 I 遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクローム P450 サブファミリー 2E1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を定期的に測定する工程を有する肝細胞癌の早期検出方法。

10. プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク 4 遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーター C 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の転写領域からなる DNA の全域又

はその一部を固定化してなる肝細胞癌検出用DNAチップ。

11. プラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4
遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群
5 から選ばれる少なくとも1つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルド
ラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブ
ミン遺伝子及びチトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群
から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の転写領域からなるDNAの全域又
はその一部を固定化してなる肝細胞癌検出用DNAチップ。

要約

本発明は、被検組織における肝細胞癌の有効な検出方法であって、被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定する工程を有する方法、並びに、被検組織におけるプラスミノーゲン遺伝子、EST51549、レチノール結合タンパク4遺伝子及びオーガニックアニオントランスポーターC遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子、並びに被検組織におけるアルドラーゼB遺伝子、カルバミルフォスフェート合成酵素I遺伝子、アルブミン遺伝子及びチトクロームP450サブファミリー2E1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現量を測定する工程を有する方法を開示する。